



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

Poliana Rodrigues Dos Santos

**Avaliação da capacidade antioxidante e composição
fenólica de cogumelo *Agaricus blazei Murrill* .**

.

BRASÍLIA, DF

2013



Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia

Trabalho de Conclusão de Curso
Julho de 2013

Avaliação da capacidade antioxidante e composição fenólica de cogumelo *Agaricus blazei* Murrill .

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado ao Colegiado do Curso de Farmácia da
Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília por
Poliana Rodrigues Dos Santos, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aluna: Poliana Rodrigues Dos Santos:

Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Fortes Gris

Brasília-DF

2013

**Avaliação da capacidade antioxidante e composição fenólica de
cogumelo *Agaricus blazei* Murrill .**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Eliana Fortes Gris
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Margô Gomes de Oliveira Karnikowski
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira
(FCE/Universidade de Brasília)

Brasília-DF

2013

Lista de Figuras

- Figura 01** – Concentração de polifenóis (mg ácido gálico/g extrato) quantificados nos extratos de cogumelo *Agaricus blazei*.....18
- Figura 02** – Concentração dos ésteres tartáricos (μg ácido cafeico/g extrato) e de flavanóis (μg catequina/g extrato) encontrados nos extratos de cogumelo *Agaricus blazei*.....20
- Figura 03** - Comparação entre a atividade antioxidante por DPPH e ABTS.....22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AbM - *Agaricus blazei* Murril

Acet - acetona

ABTS - ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

Met - metanol

Met/Acet- Metanol 80%/ Acetona 80%

TEAC - Capacidade antioxidante equivalente ao trolox

TROLOX - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%

Sumário

1.Introdução.....	09
1.1Cogumelos.....	09
1.1.1 Propriedades funcionais do cogumelos.....	10
1.1.2 Cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murril.....	11
<i>Propriedades farmacológicas</i>	11
<i>Composição química e compostos bioativos</i>	12
<i>Propriedades antioxidantes</i>	13
1. Justificativa.....	15
2. Objetivos.....	15
2.1. Geral.....	15
2.2. Específicos.....	15
3. Material e Métodos	16
4.1 Material.....	16
4.1.1.Amostras.....	16
4.1.2 Padrões e reagentes.....	16
4.2 Metodologia.....	16
4.2.1 Preparação dos extratos.....	16
4.2.2 Análise de composição fenólica.....	17
4.2.3 Análise da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	17
4.2.4 Análises estatísticas.....	17
5. Resultados e Discussão.....	17
5.1 Compostos fenólicos.....	17
5.2 Atividade antioxidante (DPPH, ABTS).....	21
5.3 Análise de correlação.....	23
6. Conclusão.....	24
7. Referências Bibliográficas.....	25

Resumo

O interesse na produção e no consumo de cogumelos está aumentando devido à sua atividade nutricional e terapêutico que está diretamente relacionado a seus compostos biologicamente ativos, responsáveis pela atividade antioxidante. *Agaricus blazei* é um cogumelo comestível originário da região de Piedade, SP. A intenção deste trabalho foi verificar a capacidade antioxidante e composição fenólica de extratos do cogumelo *Agaricus blazei*. Realizou-se desde a preparação dos extratos (Metanol 80%, Acetona 80% e Metanol 80%/Acetona 80%) as análises da composição fenólica e a análise da atividade antioxidante (DPPH e ABTS). Os melhores extratores de polifenóis totais foram os extratos Met/Acet e Acet 80%, no entanto, para os ésteres tartáricos e os flavonóis o melhor extrator foi a Acet 80%. A atividade antioxidante mais elevada foi observada com Met/Acet e extrato de Acet 80%

Palavras chave: *Agaricus blazei*, compostos fenólicos, antioxidante.

Abstract:

The interest in the production and consumption of mushrooms is increasing due to its nutritional and therapeutic activity that is directly related to its biologically active compounds responsible for antioxidant activity. *Agaricus blazei* is an edible mushroom from the region of Piedade, Brazil. The intent of this study was to determine the antioxidant capacity and phenolic composition of extracts of the mushroom *Agaricus blazei*. Held since the preparation of the extracts (methanol 80%, acetone 80% and methanol 80%/ acetone 80%) analyzes of phenolic composition and analysis of antioxidant activity (DPPH and ABTS). The best total polyphenols pullers extracts were methanol/acetone and acetone 80% However, for flavonols and tartaric esters the best extractor was acetone 80%. The highest antioxidant activity was observed with methanol / acetone and acetone extract to 80%

Keywords: *Agaricus Blazei*, antioxidant, phenolic compounds

1. Introdução

1.1 Cogumelos

Os cogumelos são fungos pertencentes às classes dos ascomicetos e basidiomicetos e constituem um grupo de seres vivos com grande diversidade há aproximadamente 300 milhões de anos. Segundo Miyaji *et al.* (2001), desde a pré história tem sido utilizado como alimento, as primeiras civilizações gregas, egípcias, romanas, chinesas e mexicanas, já utilizavam os cogumelos, e eles tinham conhecimento sobre suas propriedades terapêuticas e frequentemente utilizavam cogumelos em cerimônias religiosas (CHANG e MILES, 2004).

O número estimado de espécies de cogumelos no mundo é de 140.000 sendo que 2.000 são consideradas seguras para o consumo, apenas 25 delas são realmente utilizadas na alimentação e um número ainda menor tem sido comercialmente cultivado (COUTINHO, 2013). Apesar de muitas culturas usarem os cogumelos tanto pela sua importância gastronômica quanto pelo seu valor medicinal, o seu emprego como alimento com funções medicinais é mais notado nas culturas orientais (FURLANI, 2004).

De acordo com Moraes & Colla (2006) muitos pesquisadores consideram os cogumelos como alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos, e esse termo resume uma ampla variedade de alimentos e componentes alimentícios com vantagens médicas ou de saúde, sendo que tais produtos podem abranger nutrientes isolados.

Normalmente, quando os cogumelos são utilizados com intuito medicinal, são consumidos na forma de pós, extratos em água quente, podendo ser utilizados como bebida imediata, ou liofilizados formando pó concentrado, auxiliando o transporte e consumo (NOVAES e FORTES, 2003). Esse fato vem servindo de estímulo para os produtores brasileiros na busca de técnicas mais produtivas e na introdução de novas espécies (FURLANI e GODOY, 2005).

No Brasil o uso o consumo de cogumelos comestíveis vem crescendo significativamente devido ao reconhecimento do seu alto valor nutritivo, ao aumento da oferta e ao crescimento de pesquisas identificando as propriedades terapêuticas de substâncias isoladas de várias espécies destes fungos (DIAS et al., 2004).

De acordo com o *Codex Alimentarius*, os cogumelos comestíveis são alimentos pertencentes ao grupo Funghi, os quais podem crescer em estado silvestre ou serem cultivados, e que depois de sua elaboração estarão apropriados para serem utilizados como alimentos (ANVISA, 2013)

De acordo com a Resolução RDC n ° 272/05, de a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), cogumelos comestíveis são classificadas como produtos obtidos a partir de espécies de fungos comestíveis e tradicionalmente utilizadas como alimento, e pode ser preparado de diferentes maneiras, tais como seca, todo, fragmentado, terra ou conservados, sujeitos a secagem, fumados, cozidos, salgados, fermentados ou qualquer outro processo técnico considerado seguro para a produção de alimentos (ANVISA, 2005).

1.1.1 Propriedades funcionais dos cogumelos

Os cogumelos comestíveis apresentam alto valor nutricional, com baixo teor de gordura, e de carboidratos e apresentam além disso, significativas quantidades de proteínas e vitaminas como a tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido ascórbico, e outras relacionadas ao complexo B, bem como de minerais (BONONI e TRUFEM, 1986). Porém a sua composição química é variada de acordo com a espécie e a linhagem avaliada (EIRA et al., 1997).

Vários compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, glicoproteínas e propriedades antibióticas e antioxidantes são encontrados nos cogumelos . Dessa forma, além de ser utilizada por suas características sensoriais, o cogumelo também é usado como fonte medicinal. (COCCHI et al., 2006; VETTER, 2004).

1.1.2 Cogumelo *Agaricus blazei* Murrill (AbM)

Em 1960, foi encontrado um cogumelo diferente em Piedade interior do Estado de São Paulo (Brasil). Amostras do fungo foram enviadas ao Japão, em 1965 para estudo no Institute Iwaide. Em 1967, Dr. Heinemann, cientista belga, identificou o fungo e o denominou de *Agaricus blazei* Murrill (Figura 1), espécie natural na América do Norte, mas já descrita por W.A.Murrill, em 1945.

Wasser *et al.* (2002) propuseram para esta espécie nativa do Brasil uma nova denominação, *Agaricus brasiliensis*, no Brasil também é conhecido como cogumelo do sol e ficou conhecido assim por sua característica de crescimento e desenvolvimento, em campos abertos e ensolarados, requerendo normalmente, a luz para desenvolver os corpos de frutificação (URYU, 1995).

No Japão este cogumelo é conhecido como cogumelo Himematsutake e nos Estados Unidos, como cogumelo Royal Agaricus, Royal Sun Agaricus ou Almond Portobello.

De acordo com Braga (1999), essa espécie é taxonomicamente classificada como: Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Agaricomycetidae, tribo Agariceae, seção *Arvenses*, gênero *Agaricus*.

Propriedades farmacológicas

São muitos os usos medicinais do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill incluindo propriedades como: ações antimutagênica, bactericida e estimulante das atividades imunológicas do organismo humano (RIBEIRO e SALVADORE, 2003; VERÇOSA *et al.*, 2004). É utilizado também para doenças cardíacas, diabetes e artrites (LEE *et al.*, 2000), hipercolesterolemia e aterosclerose (FIRENZUOLI, GORI, e LOMBARDO, 2008). Valadares *et al.* (2011) em seu estudo *in vitro* sobre a atividade antileishmanial revelaram que o extrato aquoso de *Agaricus blazei* foi ativo contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania major*.

No Brasil é empregado tradicionalmente como um alimento para a prevenção do câncer, da hiperlipidemia, da arteriosclerose e da hepatite crônica (KYMURA *et al.*, 2004).

Outros efeitos como propriedades antibacterianas e antifúngicas foram associados ao cogumelo *shiitake* (*Lentinula edodes*) e ao cogumelo ostra (*Pleurotus Ostreatus*) que apresentou maior atividade antimicrobiana comparada à ciprofloxacina (HEARST et al.,2008).

Estudo de Silva e Jorge (2006) sobre o efeito sobre a hipertensão demonstrou relação entre a diminuição da pressão arterial e a concentração do extrato aquoso inoculado em ratos. Uma das hipóteses a cerca do mecanismo de ação da queda de pressão, pode ser por secreção de NO, que é um potente vasodilador e neurotransmissor (MIZUNO et al., 2000). Outra hipótese pode ser atribuída ao GABA, que é encontrado no *A. blazei* (KIMURA et al., 2002), podendo agir por bloqueio dos gânglios, e inibição da liberação de transmissores nos terminais nervosos simpáticos ou ação direta sobre os vasos sanguíneos.

Composição química e compostos bioativos

A composição química do *Agaricus brasiliensis* fresco em H₂O é de 90% a 95%. Segundo Mizuno et al.(1990), o basidiocarpo de *A. blazei* apresenta 40-45% de proteínas, 38-45% de carboidratos, 6-8% de fibras, 5-7% de minerais e 3-5% de gordura, valores baseados em relação à matéria seca (SANCHEZ, 2010). Seu valor nutricional pode ser comparado aos dos ovos, leite e carne, além disso, contêm ainda as vitaminas B1, B2, niacina e teores elevados de potássio e cálcio. Segundo o estudo de Kimura et al. (2002) foi identificada a presença dos aminoácidos prolina e valina , bem como a do ácido gama-aminobutírico (GABA).

Em estudo comparativo Tsai et al. (2007), mostrou que o teor de proteínas do *Agaricus blazei* Murril é superior ao do *shiitake* e de outras espécies de cogumelos como *Boletus edulis* (18,54%) e *Agrocybe cylindracea* (16,47%).

Os cogumelos são fontes de prebióticos, como quitina, hemicelulose, β e α -glucanas, mananas, galactanas e xilanas. Os prebióticos melhoram à saúde e estão ligados à redução do câncer do cólon, queda da absorção de colesterol pela corrente sanguínea e queda na incidência de diabete por estimular a

alteração e composição e atividade da microbiota gastrointestinal conferindo benefícios (GIBSON et al., 2004).

Algumas das atividades biológicas, principalmente a anti-tumoral, têm sido relacionadas às β -glucanas presentes na parede celular do fungo (KAWAGISHI et al., 1990; MIZUNO et al., 1990).

De acordo com Mahajna et al. (2009) os cogumelos possuem também compostos como polissacarídeos, glicoproteínas, triterpenos, esteróides, tocoferóis e compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são compostos aromáticos hidroxilados, incluem um grande número de subclasses, como os flavonóides, ácidos fenólicos, ácidos hidroxibenzóico e ácidos hidroxicinâmicos incluindo, estilbenos, lignanas, taninos, polifenóis e oxidados, em várias estruturas (D'ARCHIVIO et al., 2010). Segundo Oke e Aslim (2011), a catequina, o ácido caféico e o ácido gálico são os componentes fenólicos mais importantes nos extratos de cogumelos, além dos extratos metanólicos de cogumelos estudados apresentar conteúdo de ácido ascórbico e carotenóides, tornando-os antioxidantes *in vitro* muito eficazes, bem como conteúdo de tocoferóis relatado por Vaz et al. (2011).

Compostos fenólicos parecem ser os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante de extratos de cogumelo (ELMASTAS et al., 2007).

Propriedades antioxidantes

Os radicais livres são produzido pelas células durante o metabolismo energético normal e patológico. E têm sido associadas com muitas doenças degenerativas e processos de envelhecimento, à cardiopatias e à depressão do sistema imunológico (HALLIWELL, 2000).

Os antioxidantes são substâncias que podem retardar estes processos oxidativos, pois reagem com os radicais livres inibindo a etapa de propagação da reação de oxidação prevenindo a formação de doenças, contribuindo, dessa maneira, para uma maior longevidade. Desta forma, torna-se essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante. O organismo possui duas formas de defesa contra os danos causados pelos

radicais livres. Uma delas é a utilização de compostos antioxidantes dos alimentos e a outra, um sistema de enzimas celulares como a superóxido dismutase e catalase protegem o organismo contra os efeitos ruins dos radicais livres (BARREIROS et al., 2006 & VARGAS et al., 2008).

Em sua estrutura química, os antioxidantes naturais são semelhantes aos sintéticos por apresentarem estruturas fenólicas, moléculas que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos que interagem com radicais livres e são consumidas durante a reação (LEE et al., 2008). Porém, o estudo de Pokorný (1991) mostrou que os antioxidantes naturais são considerados melhores que os sintéticos em relação à segurança, e por isso são mais aceitos pelos consumidores.

Compostos fenólicos, comumente encontrados em vegetais, frutas e muitos alimentos, estão presentes na dieta, tais como tocoferol, ácido ascórbico, carotenóides e fenólicos, estão entre as mais potentes substâncias bioativas e terapeuticamente úteis, proporcionando benefícios de saúde associados com a redução risco de doenças crônicas e degenerativas (SILVA & JORGE, 2011).

O *Agaricus blazei* vem sendo estudando quanto à propriedades antioxidantes que podem reduzir os efeitos danosos ao organismo. O poder antioxidante muitas vezes é atribuído aos compostos fenólicos, essenciais no crescimento das plantas, dessa forma estão entre as mais potentes substâncias ativas e terapeuticamente úteis gerando benefícios de saúde diminuindo os riscos de doenças crônicas (SOOBRAATTEE et al., 2005).

Análise de Tsai et al., (2007) em extratos etanólicos e aquosos de *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* e *Boletus edulis* mostrou que o conteúdo de compostos fenólicos totais variou de 5,67-5,81 mg/g e não apresentou diferença significativa entre as espécies e entre os extratos. No entanto, o conteúdo de tocoferóis variou de 5,27- 6,18 mg/g nos extratos etanólicos e 3,18-4,4 mg/g nos extratos aquosos e a atividade antioxidante do cogumelo foi demonstrado que na concentração de 10 mg/mL, o extrato etanólico de cogumelo mostrou atividade antioxidante superior ao antioxidante sintético BHT.

2. Justificativa

O cogumelo *Agaricus blazei* por muito tempo foi utilizado empiricamente na medicina, ou seja, sem muitas evidências científicas de suas propriedades farmacológicas. Dessa forma, o interesse por estudos como o de determinação da atividade antioxidante do *Agaricus blazei* é importante para verificar seu potencial como alimento funcional. Podem ocorrer variações na composição fenólica e na atividade antioxidante por meio de fatores que interferem na biossíntese dos compostos bioativos nos vegetais como a variedade, a temperatura, o tipo de solo e o tipo de fertilizante utilizado.

Assim, ainda são necessários estudos mais aprofundados para um maior conhecimento desse cogumelo brasileiro, visando justificar e compreender as funções medicinais empíricas dessa espécie, a partir de evidências científicas. Entre esses estudos, destaca-se tanto a determinação de sua composição fenólica, como também o seu potencial antioxidante.

3. Objetivo

3.1. Geral

Determinar a concentração dos principais compostos fenólicos e a sua atividade antioxidante em diferentes extratos de *Agaricus blazei* Murril (AbM) cultivados no Brasil bem como estabelecer uma correlação entre esses resultados.

3.2. Específicos

- Elaborar os extratos de AbM com diferentes solventes : Met 80%/ Acet 80%, Acet 80% e Met 80%, e a partir desses comparar os solventes para a melhor extração do AbM;
- Determinar a concentração dos seguintes compostos fenólicos: polifenóis totais, polifenóis não polimerizados e polimerizados, ésteres tartáricos, e flavonóis;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos de AbM pelos métodos ABTS e DPPH;

- Verificar a correlação entre os resultados da concentração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de AbM.

4. Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Amostras:

Os extratos foram preparados a partir das amostras de basidiocarpo desidratado e moído do *Agaricus blazei*, obtidos da estância Valemar®, em Piedade, SP, Brasil.

4.1.2 Padrões e Reagentes:

Todos os padrões utilizados foram de grau HPLC (quercetina, ácido caféico, ácido gálico e catequina) obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Todos os reagentes utilizados foram de padrão analítico, a acetona e o metanol foram obtidos da Quimex; ácido clorídrico, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio obtidos da Vetec; Folin Ciocalteu e DPPH obtidos da Sigma. Carbonato de sódio obtido da Fmaia; molibdato sódio obtido da Merck e a vanilina da Fluka.

4.2 Metodologia

4.2.1 Preparação dos extratos

Para obtenção dos extratos fenólicos o material desidratado e moído foi pesado (50 g), extraído por maceração com 500 ml de soluções elaboradas a partir de 3 diferentes solventes em diferentes proporções: acetona:H₂O (8:2), metanol:H₂O (8:2), metanol 80%/acetona 80% durante 40 minutos em ultrassom (Cleaner- USC1450) protegido da luz, após os extratos foram deixado em descanso por 1 hora na geladeira (4 ±2 °C), em seguida filtrado à vácuo com filtro quantitativo 2 Micra (Fmaia). Essa extração foi realizada por três vezes. Após as filtrações toda solução extraída foi concentrada em evaporador rotativo (Marconi MA120) ao abrigo de luz e após liofilizado (Terroni 3000).

4.2.2 Análise de composição fenólica

Os extratos foram submetidos às análises de determinação do conteúdo fenólico através das análises de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965) polifenóis não-polimerizados e polimerizados; flavonóis e ésteres tartáricos de acordo com Paronetto (1977).

4.2.3 Análises antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das amostras dos extratos foi realizada através da avaliação da captura dos radicais livres DPPH e ABTS de acordo com Brand-Williams et al. (1995) e Re et al. (1999) respectivamente. Os resultados serão expressos como equivalentes de TROLOX (mM TEAC).

4.2.4 Análises estatísticas

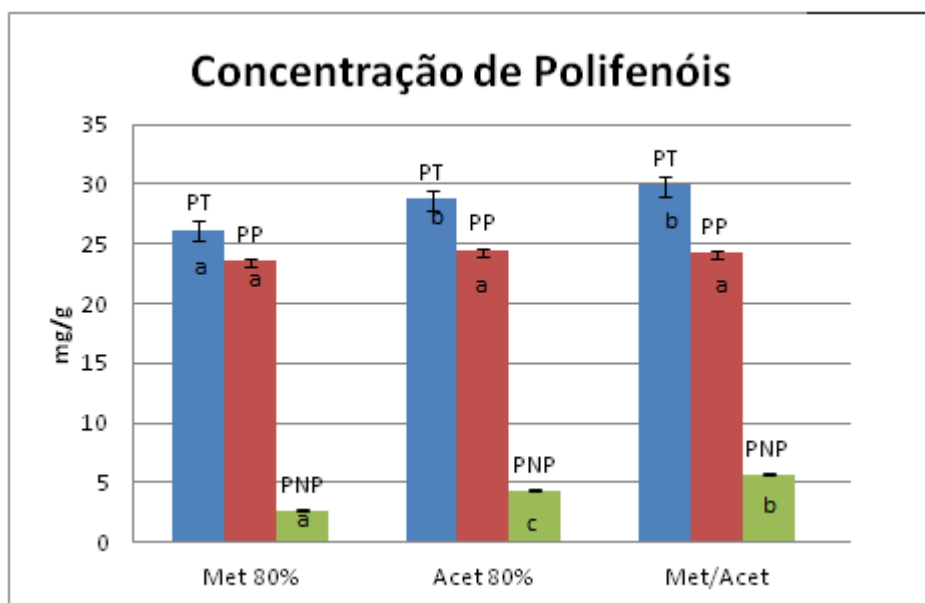
Todas as análises foram realizadas com duas repetições em triplicata. ANOVA, Análise de Correlação e Teste Tukey HSD foram realizados no programa STATISTICA 6 (2001) admitindo nível de significância de $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1 Compostos fenólicos

A Figura 1 apresenta os valores de polifenóis totais, não polimerizados e polimerizados, quantificados nos diferentes extratos de *Agaricus blazei*. Como observado, o conteúdo de polifenóis totais variou de $26,2 \pm 0,47$ – $29,9 \pm 0,43$ mg/g de ácido gálico, entre os extratos. Não houve diferença significativa entre os extratos Met/Acet e Acet 80% ($p < 0,05$), e esses foram os extratos que melhor extraíram os polifenóis totais $29,9 \pm 0,43$ e $28,8 \pm 1,98$ mg/g de ácido gálico, respectivamente, seguido do extrato Met 80%.

Figura 1. Concentração de polifenóis (mg ácido gálico/g extrato) quantificados nos extratos de cogumelo *Agaricus blazei*.



* Letras diferentes em uma mesma linha significam diferença estatística (Teste Tukey, $p < 0,05$)

PT: polifenóis totais - mg ácido gálico/g de extrato seco; PNP: polifenóis não polimerizados - mg catequina/g de extrato seco; PP: polifenóis polimerizados; Met 80% (Metanol 80%); Acet 80% (Acetona 80%); Met/Acet (Metanol 80%/Acetona 80%).

O extrato Met/Acet foi o que melhor extraiu polifenóis não polimerizados, seguido de Acet 80%, Met 80%, a concentração variou de $2,61 \pm 0,05$ - $5,62 \pm 0,24$ mg/g

Quanto aos polifenóis polimerizados não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos de Acet 80%, Met 80% e Met/Acet variando sua extração de $23,6 \pm 0,34$ à $24,49 \pm 1,32$ mg/g.

Os valores obtidos para extratos *Agaricus blazei* indicam que esse é rico em compostos fenólicos e seu conteúdo são semelhantes ou superiores aos encontrados em outros cogumelos comestíveis e medicinais, como os relatados por Barros et al. (2008), que verificaram o conteúdo de polifenóis totais (PT) a partir de extratos metanólicos de cinco espécies de *Agaricus*: *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, *Agaricus arvensis* Schaeffer, *Agaricus romagnesii* Wasser, *Agaricus sylvaticus* Schaeff., e *Agaricus silvicola* (Vittadini)

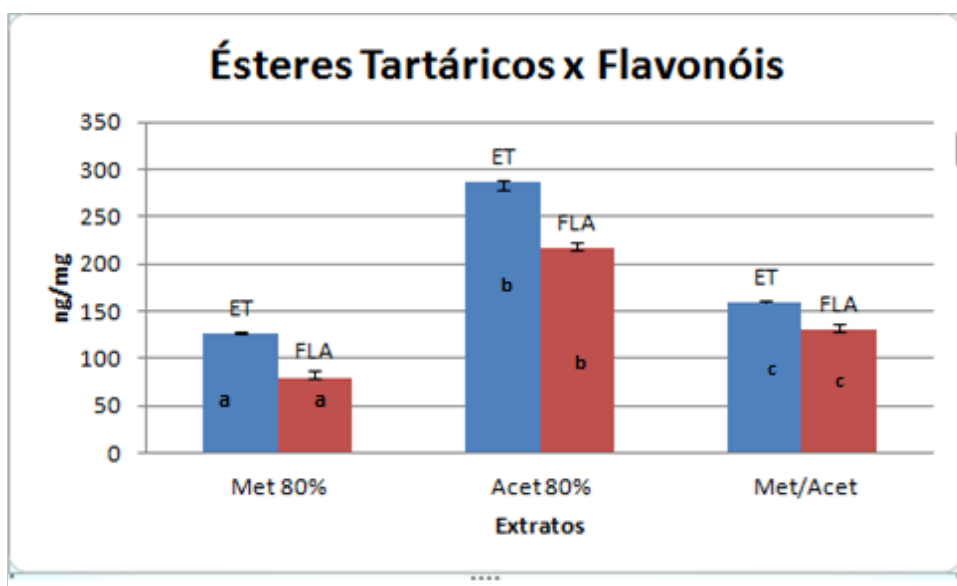
Peck , e verificaram concentrações que variaram entre 2,72- 8,95 mg/g, valores inferiores aos encontrados no presente estudo. O mesmo foi observado em outro estudo de Barros et al. (2009) que estudaram os compostos fenólicos de dezesseis espécies de cogumelos, desta vez extraídos em acetona 80%. Os valores encontrados variaram de $1,75 \pm 0,50$ a $20,32 \pm 1,87$ mg/g, também inferiores ao encontrado no presente estudo.

Análise de Tsai et al. (2007) em extratos etanólicos e aquosos de *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* e *Boletus edulis* comprados em Taiwan mostrou que o conteúdo de compostos fenólicos totais variou de 5,67-5,81 mg/g e não apresentou diferença significativa entre as espécies e entre os extratos ($p < 0,05$).

Os polifenóis constituem um grupo heterogêneo, composto de várias classes de substâncias com propriedade antioxidante, com mecanismos envolvendo tanto o sequestro de radicais livres como também a quelação de metais. Essas substâncias estão presentes em vários alimentos e bebidas. Uma fonte muito estudada em relação aos polifenóis polimerizados e não polimerizados, são as uvas, sendo o vinho o produto mais estudado, o efeitos desses na alteração ou conservação das características dos vinhos é bem relatado. (LIMA, 2012)

Freitas (2006) em sua tese, estudando o teor de polifenóis nos vinhos de diferentes regiões de Santana do Livramento e Bento Gonçalves mostrou que o conteúdo de polifenóis polimerizados variou de 0,638- 1,623 g/L entre os diferentes tipos de vinho.

Figura 2. Concentração dos ésteres tartáricos (μg ácido cafeico/g extrato) e de flavonóis (μg quercetina/g extrato) encontrados nos extratos de cogumelo *Agaricus blazei*.



* Letras diferentes em uma mesma linha significam diferença estatística (Teste Tukey, $p < 0,05$)

ET: ésteres tartáricos – μg ácido cafeico/g de extrato seco; FLA - flavonóis - μg quercetina/g de extrato seco. Met 80%(metanol 80%); Acet 80%(acetona 80%) ; Met/Acet (metanol80%/acetona80%).

Os ésteres tartáricos vêm sendo estudados associados à produtos como vinho, pois podem estar envolvidos com o escurecimento desses. Um estudo realizado por Fernández-Zurbano et al. (1995) mostrou que embora os ésteres tartáricos apresentem uma baixa correlação com o escurecimento em vinhos brancos, esses compostos podem dar início ao processo de escurecimento e participar na polimerização com outros compostos como catequina e epicatequina.

O extrato que apresentou a melhor extração dos ésteres tartáricos foi Acet 80%, seguido de Met/Acet e por fim Met 80% variando a concentração de $126,7 \pm 1,44$ - $287,0 \pm 3,98 \mu\text{g/g}$.

Lima (2012) estudou o perfil fenólico e atividade antioxidante de vinhos GOETHE demonstrou que o nível de polifenóis polimerizados variou de 233,73-365,22 mg/L de catequina entre as diferentes amostras. Porém o nível de polifenóis não polimerizados variou de 29,44 à 57,54 mg/L. Quanto à concentração dos ésteres tartáricos nos vinhos e encontrou-se uma concentração de 27,36 à 48,39 mg/L de ácido cafeico.

Quanto aos flavonóis (quercetina, miricetina, kaempferol), a Acet 80% foi o melhor solvente extrator ($216,1 \pm 7,22 \mu\text{g/g}$), seguida de Met/Acet e depois Met 80%. Cataneo et al. (2008) em sua pesquisa sobre atividade antioxidante e conteúdo fenólico em uvas de diferentes variedades revelou que houve um aumento significativo do teor de flavonóis nos extratos acetônicos, assim como nesse estudo. Já Lima (2012) demonstrou níveis de flavonóis que variavam de 55,26 à 84,59 mg/L de quercetina.

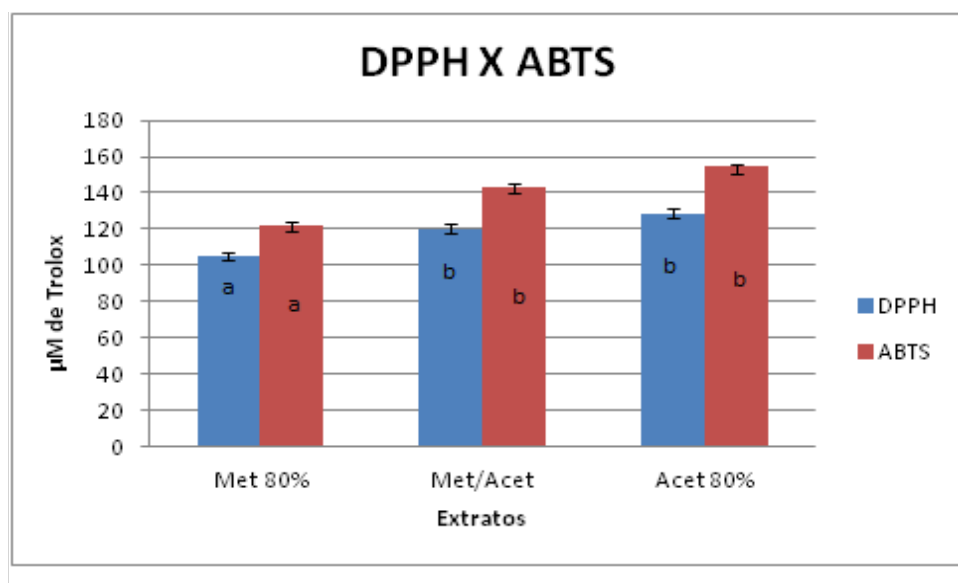
5.2 Atividade antioxidante (DPPH, ABTS)

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando-se DPPH e ABTS. O método DPPH se baseia no seqüestro do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), um ensaio fotométrico onde esse radical livre, que apresenta coloração roxa intensa em solução alcoólica, se reduz em presença de moléculas antioxidantes, formando o 2,2 difenil-1-picrilhidrazil, que é incolor (VARGAS et al., 2008).

O outro método utilizado foi o da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. (KUSHOSKI *et al.*, 2005)

O radical ABTS é solúvel em água e solução alcoólica, assim, pode estar dissolvido em meio aquoso e orgânico, dessa maneira a atividade antioxidante pode ser medida em meio hidrofílico ou lipofílico dependendo da natureza da amostra. Já o DPPH é um radical solúvel em solução alcoólica. Em contraponto radical DPPH pode somente ser dissolvido em meio orgânico, especialmente etanol, essa uma limitação para esse método (GULCIN *et al.*, 2010).

Figura 3. Comparação entre a atividade antioxidante por DPPH e ABTS



* Letras diferentes em uma mesma linha significam diferença estatística (Teste Tukey, $p \leq 0,05$)

- DPPH e ABTS: μM de TROLOX. Met 80% (Metanol 80%); Acet 80% (Acetona 80%); Met/Acet (Metanol/Acetona);

Como observado na Figura 3 os valores de DPPH variaram de $104,61 \pm 1,11$ à $128,08 \pm 3,84$ μM de Trolox, sendo o metanol/acetona e acetona 80% os solventes que apresentaram melhor atividade antioxidante, seguido de metanol 80% ($p < 0,05$).

O radical ABTS apresentou uma maior atividade antioxidante quando comparado ao DPPH. (TIVERON, 2010; LIMA, 2012; SILVA *et al.*, 2011). Os melhores extratos foram o de metanol/acetona e acetona 80% sem diferença significativa ($p < 0,05$), seguido de metanol 80%.

Os resultados mostraram que o extrato metanol/acetona e acetona 80% foram os que melhor extraíram os compostos fenólicos, e ao analisar a atividade antioxidante (Figura 3) em ambos os métodos (DPPH, ABTS), foi observado que também obtiveram maior atividade.

Ambos os métodos DPPH e ABTS indicaram alta atividade e as diferenças observadas podem ser em parte, relacionado com o fato de diferentes extratos podem conter diferentes tipos de polifenóis com reatividades diferentes.

Verificou-se que os extratos Metanol/Acetona e Acetona 80% foram os que mais extraíram todas as substâncias, estudadas e também que

apresentaram atividade antioxidante. Segundo Choi et al. (2002) os compostos polifenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante em frutos. Diversos estudos apontam o metanol como melhor extrator de moléculas antioxidantes, porém esse trabalho mostrou que quando associado à acetona ou utilizando apenas Acetona 80% obtêm-se melhor atividade extratora e antioxidante, pois em função da polaridade dos solventes utilizados é possível extrair diferentes compostos ativos.

Devido a maior atividade antioxidante dos extratos contendo metanol/acetona ou somente Acetona 80% é possível que a fração extraída nesses solventes tenha mais importante ação antioxidante (BARROS et al., 2007a; BARROS et al., 2007b; BARROS et al., 2007c; BARROS et al., 2008; MAU et al., 2002 & VAZ et al., 2010).

5.1.2. Análise de correlação

A análise de correlação entre os resultados obtidos da quantificação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante dos extratos do cogumelo *Agaricus blazei* mostrou que o conteúdo total de polifenóis, polifenóis não polimerizados, ésteres tartáricos e flavonóis apresentaram correlação positiva com a atividade de ambos os radicais DPPH ($R = 0,79$; $R = 0,99$; $R = 0,88$ e $R = 0,95$ respectivamente) e ABTS ($R = 0,80$; $R = 0,99$; $R = 0,87$; $R = 0,94$ respectivamente). Entre os compostos fenólicos analisados verificou-se que os polifenóis não polimerizados apresentaram os maiores valores de correlação com ambos os radicais DPPH ($R = 0,99$) e ABTS ($R = 0,99$).

Entre os compostos fenólicos, verificou-se correlação significativa ($p < 0,05$) entre os polifenóis polimerizados somente com os polifenóis não polimerizados ($R = 0,78$) já os polifenóis não polimerizados obtiveram correlação positiva com todas as substâncias e os flavonóis apresentaram forte correlação com ésteres tartáricos ($R = 0,98$).

Uma forte correlação positiva foi encontrada entre a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS indicando que os dois métodos são relevantes e confiáveis para avaliação da capacidade antioxidante do cogumelo (SILVA et al., 2011; LIMA, 2012).

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que aos extratos elaborados com o cogumelo *Agaricus blazei* são ricos compostos em fenólicos, apresentando valores significativos de compostos tais como: polifenóis totais, polimerizados e não polimerizados, ésteres tartáricos e flavonóis. Além disto, estes extratos apresentaram uma alta atividade antioxidante contra os radicais DPPH e ABTS, destacando-se os extratos contendo acetona (Acet 80% e Met/Acet). O melhor solvente extrator de polifenóis totais em relação a todas as análises foi o solvente Metanol 80%/Acetona 80%, já para os ésteres tartáricos e flavonóis foi a Acetona 80%.

Os resultados também evidenciaram uma correlação positiva entre os compostos fenólicos analisados e a atividade antioxidante dos extratos ($p < 0,05$)

Uma correlação positiva e significativa de ($R = 0,79$) foi encontrada entre os polifenóis totais e ambos os métodos DPPH e ABTS ($R = 0,79$; $R = 0,80$ respectivamente). Uma forte correlação positiva ($R = 0,91$) foi encontrada o DPPH e ABTS indica que os dois métodos são relevantes e confiáveis para esse tipo de estudo.

Espera-se que esses resultados contribuam com outras pesquisas paralelas que estão sendo realizadas pelo grupo, que visam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas a partir de AbM, bem como de promover a conservação, manejo e valorização de recursos naturais brasileiros.

7. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. (Brasil). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº. 272, DE 22 de Setembro de 2005. Disponível em:

<http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/gerados/resol_272_set_2005.pdf> Acesso em: 14 jul. de 2013

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. (Brasil). Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em 11 de janeiro de 2005. VIII-Lista das Alegações Aprovadas. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 14 jul. de 2013.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; FERREIRA, I.C.F.R. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. **Food Chem. Toxicol.** 45: 1731–1737.2007a.

BARROS, L.; FERREIRA, M-J.; QUEIRÓIS, B.; FERREIRA, I.C.F.R.; BAPTISTA, P. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chem**, 103: 413–419, 2007b.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; CORREIA, D.M; MORAIS J.S; FERREIRA, I.C.F.R. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. **J. Agric. Food Chem.** 55: 4781–4788, 2007c.

BARROS, L.; VENTURINI B.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO L.; FERREIRA, I.C.F.R. Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. **J. Agric. Food Chem.** 56: 3856–3862, 2008.

BONONI, V.L.R.; TRUFEM, S.F.B. Cogumelos Comestíveis. São Paulo: **Coleção Brasil Agrícola**, 1986.

BRAGA, G. C. Produtividade de *Agaricus blazei* Murrill em função do ambiente de cultivo, massa do substrato e camada de cobertura. Tese. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 1999.

BARREIROS. A.L.B.S; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**. 29: 113-123, 2006.

BRAND-WILLIAM W.; CUVELIER M.E; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT**, 28: 25-30, 1995.

CATANEO, C.B; CALLARI, V.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI E.M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**. 29: 93-102, 2008.

CHANG, ST.; MILES, P.G. Mushrooms Cultivation. Nutritional Value Medicinal Effect and Environmental Impact CRC Press, Boca Raton, 2004.

CHOI C.W.; KIM S.C.; HWANG S.S.; CHOI B.K.; Ahn H.J, LEE M.Y.; PARK S.H; KIM S.K. Antioxidant activity and radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Sci.**, 163: 1161-1168, 2002.

COCCHI, L. ; VESCOVI, L. ; PETRINI, L.E. ; PETRINI, O. Heavy metals in edible mushrooms in Italy. **Food Chemistry**, 98: 277-284, 2006.

COUTINHO, L.N. Cultivo de espécies de cogumelo comestíveis. Disponível em: <<http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, 11: 1321–1342, 2010 .

DIAS E.S; ABE C.; SCHWAN R.F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus Blazei*. **Sci. Agric**, 61: 545-549, 2004..

EIRA, A.F.; BRAGA, G.C. Manual do cultivo teórico e pratico do cultivo de cogumelos comestíveis. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas Florestais, 34-36, 1997.

ELMASTAS, M.; ISILDAK, O.; TURKEKUL, I., TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, 20: 337-345, 2007.

FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; FERREIRA, V.; PEÑA, C.; ESCUDERO, A.; SERRANO, F.; CACHO, J. Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their chemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43: 2813-2817, 1995.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. **Evid Based Complement Alternat Med**. 5: 3-15, 2008

FREITAS, D.M. Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis Vinifera*) Tintas em Diferentes Ambientes. Tese - Centro de Ciências Rurais, Programa de PósGraduação em Agronomia, Santa Catarina, 2006.

FURLANI, R.P.Z, GODOY, H,T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 64 :149-54, 2005.

FURLANI, R. P. Z. Valor nutricional de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

GIBSON, G. R.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R. A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **British Journal of Nutrition**, London, 93: 31-34, 2004.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 11: 210-218, 2010.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, 355: 1179-1180. 2000.

HEARST, R.; NELSON, D.; McCOLLUM, G.; MILLAR, B. C.; MAEDA, Y. GOLDSMITH, C. E.; ROONEY, P. J.; LOUGHREY, A.; RAO, J. R.; MOORE, J. E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of

Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*.15: .5-7, 2008.

KAWAGISHI, H.; Kanao, T.; Inagaki, R.; Mizuno T. Formolysis of a potent antitumor (1→6)-β-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers*, 12: 393-403, 1990.

KIMURA, Y.; KIDO, T.; TAKAKU, T.; SUMIYOSHI, M.; BABA, K. Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: Its antitumor and antimetastatic actions. **Cancer Scienc.**: 95: 758-764, 2004.

KIMURA, M.; HAYAKAWA, K.; SANSAWA, H. Involvement of γ-aminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats . **Jpn J Pharmacol**. 89: 388-394, 2002.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FEET, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25: 726-732, 2005.

LEE I.P; KANG B.H; ROH J.K; KIM J.R. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. **Food Chem Toxicol**;46: 87-95, 2008.

LIMA, N.E.F.Perfil fenólico e atividade antioxidante de vinhos Goethe-caracterização e evolução durante o armazenamento em garrafa. Dissertação - Universidade federal de Santa Catarina; Florianópolis 2012.

MAU, J.L.; LIN, H.C.; CHEN, C.C. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. **J. Agric. Food Chem**. 50,: 6072–6077, 2002.

MAHAJNA, J.; DOTAN, N.; ZAIDMAN, B.Z.; PETROVA, R.D.; WASSER, S.P. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Gonoderma lucidum*. **Nutr Cancer**, 61:16-26, 2009.

MIYAJI, C.K; KAORI, C.; CÓLUS, I.; DE SYLLOS, M. Shiitake, um Cogumelo mutagênico ou antimutagênico. 22: 11-17, 2001.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T., ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “himematsutake,” the fruiting body of *Agaricus blazei* Murril. **Agric. Biol. Chem.**, 54: 2889-2896, 1990.

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacol** 46: 113-121, 2000.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev. Eletr. Farm.** 3: 109-122, 2006.

NOVAES, M.R.C. G.; FORTES, R.C. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família agaricaceae. **Rev. Nut.r Brasil.**, 4: 207-217, 2003.

PARONETTO, L. Polifenoli e Tecnica Enologica. Selepress: Milan, p.132, 1977;

POKORNY J. Natural antioxidants for food use. **Trends Food Sci Technol**; 2: 223-227, 1991.

RIBEIRO, L.R; SALVDORI, D.M.F. Dietary components may prevent mutation - related diseases in humans. **Mutat Res-Rev Mutat** 544: 195-201, 2003.

RE, R., N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG; C. RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay. **Free Radical Biol. Med.** 26: 1231-1237, 1999.

SILVA, A.C.; JORGE, N. Antioxidant properties of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts. **Journal of Food Quality**, 34: 386–394, 2011.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.** 16: 144-158, 1965.

SOBRATTEE, M. A. NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMAB, Ou.I. BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 579: 200-213, 2005.

TIVERON, A.P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TSAI, S.; TSAI, H.; MAU, J. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie – **Food Science and Technology**, London. 40: 1392-1402, 2007..

URYU, E.N. Cogumelo medicinal – *Agaricus blazei*. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI; 1995.

VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; OLIVEIRA, J.S.; CHÁVEZ, F.M.A.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.; LEITE, J.P.V.; SANTORO, M.M.; RÉGIS, W.C.B.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitol. Int.** 60: 357–363, 2011.

VERÇOSA, J. D; MELO, M.M.; DANTAS-BARROS, A.M; GOMES, A.M; SILVA J. P.G.; LAGO, E.P. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. **Rev Bras Farmacogn** 14: 32-34, 2004.

VAZ, J.A.; HELENO, S.A.; MARTINS, A.; ALMEIDA, G.M.; VASCONCELOS, M.H.; FERREIRA, I.C.F.R. Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: in vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, 48: 2881-2884, 2010.

VARGAS, P.N.; HOELZEL, S.C.; ROSA, C.S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. *Alimentos e Nutrição*. 19: 11-15, 2008.

WASSER, S. P.; DIDUCK, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun *Agaricus* (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 4: 267-290, 2002